

Produção de Lipases com Atividade de Hidrólise por *Aspergillus* Utilizando Subprodutos Agroindustriais, Óleo de Soja e Glicerol

Lipases Production with Hydrolytic Activity by *Aspergillus* Using Agroindustrial Byproducts, Soy Oil and Glycerol

Christian Oliveira Reinehr

Universidade de Passo Fundo – UPF, Passo Fundo, RS

reinehr@upf.br

Luísa Bortoluzzi

Universidade de Passo Fundo – UPF, Passo Fundo, RS

luisabortoluzzi@gmail.com

Valquíria Quoos de Moraes

Universidade de Passo Fundo – UPF, Passo Fundo, RS

96403@upf.br

Tatiana Moresco Smaniotto

Universidade de Passo Fundo – UPF, Passo Fundo, RS

tati.ms@hotmail.com

Cindiele Karen Zen

Universidade de Passo Fundo – UPF, Passo Fundo, RS

112811@upf.br

Débora de Oliveira

Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis, SC

debora@enq.ufsc.br

Helen Treichel

Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS, Erechim, RS

helentreichel@gmail.com

Recebido em 31/10/2014 - Aceito em 16/12/2015.

| | | | | | |
|-------|-------|-----------|---------|------|-------------------------------|
| RECEN | 18(1) | p. 97-115 | jan/jun | 2016 | DOI: 10.5935/RECEN.2016.01.05 |
|-------|-------|-----------|---------|------|-------------------------------|

Luciane Maria Colla

Universidade de Passo Fundo – UPF, Passo Fundo, RS

lmcolla@upf.br

Resumo: Lipases são enzimas aplicáveis a inúmeros setores industriais, podendo ser obtidas de fontes microbianas, a partir de fermentação em estado sólido utilizando matrizes oriundas de resíduos agroindustriais. Este trabalho teve como objetivo produzir lipases com atividade de hidrólise pelo fungo *Aspergillus* utilizando resíduos agroindustriais e estudar a influência da concentração do indutor e da umidade do processo conduzido via fermentação em estado sólido. Foram utilizados dois planejamentos experimentais em sequência, um fatorial completo 3^2 (com três fungos do gênero *Aspergillus* e três indutores) e outro 2^2 com dois pontos centrais (com umidade variando entre 60% e 70% e concentração de indutor variando entre 0% e 4%). As maiores atividades de hidrólise foram obtidas com o fungo *Aspergillus niger* O-4 e com o óleo de soja como indutor, sendo que tanto a umidade quanto a concentração de indutor apresentaram influência significativa na produção de lipases. As maiores atividades de hidrólise, em torno de 25 U/g, foram encontradas nos pontos centrais (65% de umidade e 2% de óleo de soja) para 6 dias de fermentação.

Palavras-chave: *Aspergillus niger*; fermentação em estado sólido; indutores; lipases; resíduos.

Abstract: Lipases are applicable enzymes to numerous industrial sectors and may be obtained from microbial sources through solid state fermentation, by using matrices derived from agroindustrial residues. This study aimed to produce lipases with hydrolytic activity by *Aspergillus* using agroindustrial byproducts and also to investigate the influence of moisture and inducer concentration through solid state fermentation. Two experimental designs in sequence were carried out, a 3^2 full factorial design (with three fungi from *Aspergillus* genus and three inducers) and another 2^2 full factorial with two central points (with moisture ranging between 60% and 70% and inducer concentration ranging between 0% and 4%). The highest hydrolytic

activities were found with fungus *Aspergillus niger* O-4 and soybean oil as inducer. Both moisture and inducer concentration presented a significant effect on lipase production. The highest hydrolytic activities around 25 U/g were found in the central points (65% moisture and 2% soy bean oil) for 6 days of fermentation.

Keywords: *Aspergillus niger*; inducers; lipases; solid state fermentation; residues.

1 Introdução

A tecnologia de produção de enzimas é uma parte da ciência que está em plena evolução, em função da melhor compreensão da estrutura de cada enzima e sua respectiva aplicação, seu crescente uso e busca por novas ferramentas ou abordagens, tanto de produção quanto de purificação.

O mercado global de enzimas industriais foi avaliado em 4,2 bilhões de dólares em 2014 e espera-se que cresça a uma taxa de 7,0% ao ano entre 2015 e 2020, ultrapassando 7 bilhões de dólares [1,2]. Estima-se que o Brasil poderia produzir mais de 10^7 toneladas de amilases, 10^7 toneladas de celulasas e 10^8 toneladas de lipases se utilizasse apenas os resíduos agroindustriais renováveis disponíveis, evidenciando o potencial brasileiro para produção de enzimas [3].

As lipases podem catalisar reações de hidrólise parcial ou total de triacilgliceróis em ácidos graxos livres, mono e diacilgliceróis, atuando também em reações de esterificação, interesterificação e transesterificação, quando em ambiente com restrição de água. São aplicáveis a diversos setores, como indústrias de alimentos, detergentes, tecidos, polpa e papel, gorduras, óleos, tratamento de efluentes, polímeros biodegradáveis, fármacos, testes de diagnóstico, cosméticos, chás, aplicações médicas, biossensores, couro, biodiesel, como revisado por Treichel et al [4], Contesini et al [5], Messias et al [6], Colla, Reinehr e Costa [7], Singh e Mukhopadhyay [8], Nagarajan [9] e Kapoor e Gupta [10].

Enzimas microbianas são preferíveis para aplicações industriais em virtude dos menores tempos de geração para produção, da facilidade de manipulações genéticas, do aumento de escala e purificação, especificidade e estabilidade. As lipases industri-

ais são produzidas principalmente por fungos filamentosos, em especial dos gêneros *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Geotrichum* e *Fusarium* [9, 11, 12]. A maior utilização industrial dessas enzimas, entretanto, está condicionada à diminuição dos custos de produção. Estratégias para este fim incluem a seleção de novos microrganismos produtores, bem como a utilização de meios de cultivo de baixo custo. Neste sentido, o uso da fermentação em estado sólido para a produção de lipases fúngicas é apropriado, já que pode utilizar resíduos agroindustriais e/ou coprodutos na composição dos meios de cultivo, como farelo de soja [13, 14], semente de mostarda [15], amendoim, nozes, farelo de arroz, farelo de cevada [16], torta de mamona e bagaço de cana [17].

Os fatores que podem afetar a produtividade destes bioprocessos são principalmente relacionados aos microrganismos produtores, aos tipos e concentrações de nutrientes, ao pH, à temperatura e à presença e concentração de indutores [4]. A realização de pesquisas que utilizem microrganismos isolados de novos ambientes, bem como a utilização de resíduos agroindustriais na composição dos meios é necessária, a fim de se obterem elevadas produtividades a custos menores, assim como a avaliação dos indutores empregados, como o óleo de soja (rico em ácidos graxos essenciais) e o glicerol (subproduto da fabricação de biodiesel).

Os objetivos deste trabalho foram produzir lipases com atividade de hidrólise a partir de fungos filamentosos utilizando resíduos agroindustriais, selecionar indutores e estudar a influência da concentração do indutor e da umidade do processo conduzido via fermentação em estado sólido.

2 Material e métodos

2.1 Microrganismos

Os fungos utilizados foram do gênero *Aspergillus*, sendo: cepa O-4, previamente isolada por Colla et al [18] de solo contaminado com óleo diesel e selecionada como boa produtora de lipases com atividade de hidrólise através de fermentação em estado sólido; cepas *Aspergillus niger* e *Aspergillus fumigatus*, pertencentes ao banco de cepas do Laboratório de Fermentações da Universidade de Passo Fundo.

A cepa O-4 foi submetida à identificação genética utilizando a metodologia citada por Smaniotto et al [19], no Centro de Energia Nuclear na Agricultura (Cena) da Universidade de São Paulo. As sequências de bases nitrogenadas da cepa O-4 foram comparadas aos dados (18S rRNA) obtidos no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). A cepa foi identificada como *Aspergillus niger* cepa DAOM (100% de identidade, código de acesso no *GenBank*: KC545858.1) [20].

2.2 Manutenção e preparo do inóculo

As cepas foram mantidas a 4 °C em tubos de ensaio com ágar batata dextrose, com repicagens periódicas a cada três meses.

Para o preparo do inóculo foram adicionados 10 mL de solução de Tween 80 (0,1%) aos tubos de ensaio com ágar, realizando-se a raspagem dos esporos com alça de platina. O inóculo foi preparado adicionando-se 2,5 mL da suspensão de esporos obtida em erlenmeyers de 1 L contendo 100 mL de ágar batata dextrose, com posterior incubação a 30 °C durante 7 dias. Após o crescimento fúngico na superfície do ágar adicionou-se 50 mL de Tween 80 (0,1%), seguido de uma raspagem dos esporos e filtração em gaze estéril para retenção das hifas, seguindo metodologia descrita por Colla et al [18].

2.3 Preparo do meio de cultivo e inoculação

O meio de cultivo utilizado foi preparado conforme Colla et al [18] a partir da mistura de 85% de farelo de soja e 15% de casca de soja. Foram pesados 25 g da mistura e adicionados em béqueres de polipropileno de 600 mL tampados com manta acrílica hidrofóbica. O meio de cultivo foi autoclavado a 121 °C por 20 min. A umidade foi ajustada pela adição de água destilada estéril, com posterior adição de indutores. Estas variáveis foram controladas segundo os níveis preditos no delineamento experimental. A inoculação foi feita com a adição de 1 mL da solução de esporos para cada béquer, correspondendo a uma concentração final de esporos de 10^7 esporos/g de substrato.

2.4 Seleção de microrganismos e indutores

A fim de selecionar os microrganismos com maior potencial de produção de lipase com atividade de hidrólise foi realizado um planejamento fatorial completo 3^2 , analisando o tipo de microrganismo (*A. fumigatus*, *A. niger* e *A. niger* O-4) e o indutor (óleo de soja, glicerol e mistura de ambos), totalizando 9 condições experimentais distintas.

Nesta etapa a umidade foi fixada em 65% e os experimentos (feitos em duplicata) foram incubados em estufa a 30 °C. Após 6 dias (144 h) de fermentação foi efetuada a coleta das amostras para a determinação da atividade de hidrólise.

2.5 Efeito da umidade e da concentração de indutor

De acordo com os resultados obtidos no planejamento fatorial completo 3^2 realizou-se um planejamento fatorial completo 2^2 com dois pontos centrais, estudando-se a influência da umidade (60%, 65% e 70%) e da concentração de indutor (0%, 2% e 4%), totalizando sete condições experimentais. Os experimentos foram incubados em estufa a 30 °C, sendo realizada a coleta das amostras para a determinação da atividade de hidrólise (feita em triplicata) após 6 dias (144 h) de fermentação.

2.6 Determinação da atividade de hidrólise e da produtividade

As enzimas foram extraídas utilizando a proporção de 1 g de farelo fermentado e 10 mL de tampão fosfato de sódio (0,1 mol/L, pH 7,0). Os frascos foram submetidos à agitação a 160 rpm por 30 min a 37 °C. Após, filtrou-se em algodão para a remoção de sólidos suspensos, obtendo-se os extratos enzimáticos brutos.

A atividade de hidrólise foi determinada, em duplicata, através do método proposto por Burkert, Maugeri e Rodrigues [21], o qual se baseia na titulação com hidróxido de sódio dos ácidos graxos livres liberados pela ação da lipase presente no extrato enzimático sobre os triacilgliceróis do azeite de oliva emulsionados em goma arábica.

Em frascos de 250 mL foram adicionados 2 mL de tampão fosfato de sódio (0,1 mol/L, pH 7,0), 5 mL de emulsão preparada com 75 mL de goma arábica a 7% e

25 mL de azeite de oliva. A este sistema foi adicionado 1 mL de extrato enzimático e colocado a 37 °C durante 30 min. Após a incubação, a reação foi paralisada pela adição de 15 mL de solução de acetona e etanol (1:1) com posterior titulação dos ácidos graxos liberados com uma solução de hidróxido de sódio 0,01 mol/L até atingir pH 11.

Uma unidade de atividade de hidrólise foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de ácido graxo por minuto por grama de farelo fermentado úmido ($1 \text{ U/g} = 1 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$), nas condições do ensaio, conforme a equação (1).

$$AH = \frac{(V_a - V_b) \times M \times 1000 \times f_d}{t \times m} \quad (1)$$

Sendo:

AH : Atividade de hidrólise (U/g);

V_a : Volume de NaOH titulado com a amostra (mL);

V_b : Volume de NaOH titulado com o branco (mL);

M : Concentração molar da solução de NaOH (mol/L);

f_d : Fator de diluição;

t : Tempo de reação (min);

m : Massa de amostra (g).

A produtividade enzimática foi definida em unidades de atividade de hidrólise por tempo (U/d), sendo calculada utilizando a equação (2).

$$P = \frac{AH_{tf} - AH_{ti}}{t_f - t_i} \quad (2)$$

Sendo:

P : Produtividade enzimática (U/d);

AH_{tf} : Atividade de hidrólise no tempo final (U/g);

AH_{ti} : Atividade hidrólise no tempo inicial (U/g);

t_f : Tempo final (d);

t_i : Tempo inicial (d).

3 Resultados e discussão

3.1 Seleção de microrganismos e indutores

A tabela 1 apresenta os resultados de atividade de hidrólise após os 6 dias de fermentação, segundo os experimentos do Planejamento Fatorial Completo 3^2 .

As maiores atividades de hidrólise foram obtidas utilizando-se o fungo *Aspergillus niger* O-4, de 24,17 U/g em 6 dias de fermentação. Em relação ao indutor, observou-se que as maiores atividades de hidrólise foram encontradas utilizando-se 2% de óleo de soja, com valores de atividade de 7,69 U/g, 1,03 U/g e 24,17 U/g, para os fungos *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus niger* O-4, respectivamente.

Tabela 1. Resultados de atividade de hidrólise das lipases produzidas nas condições do planejamento fatorial completo 3^2 utilizado para a seleção de fungos e indutores por fermentação em estado sólido

| Experimento | X ₁ (Fungo) | X ₂ (Indutor) | AH (U/g)* |
|-------------|--------------------------------|--------------------------|--------------|
| 1 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | OS (2%) | 7,69 ± 0,12 |
| 2 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | G (1%) | 3,97 ± 0,24 |
| 3 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | OS (2%) e G (1%) | 0,00 ± 0,00 |
| 4 | <i>Aspergillus niger</i> | OS (2%) | 1,03 ± 0,27 |
| 5 | <i>Aspergillus niger</i> | G (1%) | 0,00 ± 0,00 |
| 6 | <i>Aspergillus niger</i> | OS (2%) e G (1%) | 1,64 ± 0,02 |
| 7 | <i>Aspergillus niger</i> (O-4) | OS (2%) | 24,17 ± 6,23 |
| 8 | <i>Aspergillus niger</i> (O-4) | G (1%) | 5,87 ± 1,52 |
| 9 | <i>Aspergillus niger</i> (O-4) | OS (2%) e G (1%) | 7,75 ± 5,69 |

AH: atividade de hidrólise; OS: óleo de soja; G: glicerol

* Resultados apresentados como média ± desvio padrão

Os lipídios são indutores essenciais para produção de lipases [6] e o óleo de soja, assim como outros óleos vegetais, pode ser considerado uma fonte de carbono comumente utilizadas para esse processo [22]. Porém, devido ao alto custo desses óleos, e sua importância como alimento, torna-se importante o estudo de fontes alternativas como o glicerol [23].

Oliveira et al [24] compararam os processos de fermentação submersa e em estado sólido para produção de lipases com *Fusarium* sp. testando como fontes de carbono os

óleos de soja, dendê, linhaça, milho, oliva, crambe e frango. Os autores obtiveram até 87% de redução de custos de produção quando utilizaram o processo de fermentação em estado sólido, sendo que a maior atividade de hidrólise obtida foi de 5 U/mL.

O óleo de soja possui ácidos graxos insaturados, como o linoleico (50%) e linolênico (7%), além de oleico (24%). Como as lipases atuam sobre os ácidos graxos, a adição de óleo de soja no meio de cultivo do fungo induz a produção de enzimas que tenham maior afinidade com ácidos graxos insaturados e de cadeia longa [25].

Embora o glicerol seja assimilável por bactérias e leveduras sob condições aeróbicas e anaeróbicas para a obtenção de energia metabólica [26], em substratos fermentescíveis contendo glicose e utilizando glicerol como principal fonte de carbono, pode haver repressão durante o crescimento celular, o que justificaria a menor produção de lipases com esse indutor [27].

Os resultados do planejamento experimental mostraram que o fungo *Aspergillus niger* O-4 com adição de 2% óleo de soja apresentou a melhor condição de produção de lipase com atividade hidrolítica. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Rigo et al [28], que na produção de lipases por fermentação em estado sólido com o fungo *Penicillium* 58F, com suplementação do meio de cultivo com ureia e óleo de soja, foi obtida a maior atividade hidrolítica de 147 U/g em 72 h.

Os efeitos estimados através da análise de variância, os quais são apresentados na tabela 2 e que foram determinados a partir dos resultados de produtividade enzimática (Figura 1), indicaram que o fator de interação entre o microrganismo na forma linear e o indutor na forma quadrática, assim como o fator de interação entre o microrganismo na forma quadrática e o indutor na forma linear, mostraram influência significativa ($p < 0,05$).

O fungo apresentou efeito linear positivo e efeito quadrático negativo, ambos significativos ($p < 0,05$), corroborando as conclusões anteriores de que os resultados de maior atividade de hidrólise foram obtidos nos níveis superiores desta variável, ou seja, utilizando o fungo *Aspergillus niger* O-4. Observa-se, na figura 1, a existência de menores resultados de produtividade no ponto central do planejamento, utilizando o fungo *A. niger*.

Em relação à variável indutor, o efeito linear foi significativo e negativo, indicando

Tabela 2. Efeitos estimados a partir da análise de variância da produtividade enzimática em função do microrganismo e do indutor para a fermentação em estado sólido utilizando resíduos agroindustriais

| Fonte de variação | Efeito estimado | p |
|---------------------------------|-----------------|--------|
| Microrganismo (X_1) (L) | 1,452 | 0,0005 |
| Microrganismo (X_1) (Q) | -1,225 | 0,0006 |
| Indutor (X_2) (L) | -1,305 | 0,0011 |
| Indutor (X_2) (Q) | -0,628 | 0,0272 |
| Interação X_1 (L) * X_2 (L) | -0,727 | 0,0593 |
| Interação X_1 (L) * X_2 (Q) | -0,851 | 0,0172 |
| Interação X_1 (Q) * X_2 (L) | 1,056 | 0,0056 |
| Interação X_1 (Q) * X_2 (Q) | 0,304 | 0,2604 |

p: probabilidade; L: efeito linear; Q: efeito quadrático.

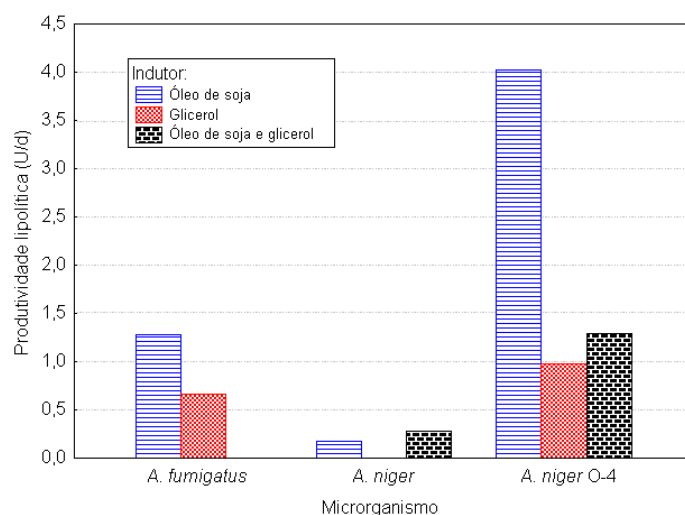


Figura 1. Produtividade enzimática dos fungos estudados em função do tipo de indutor utilizado

que maiores produtividades foram obtidas no nível inferior desta variável, ou seja, com a utilização de óleo de soja.

Os fungos filamentosos são reconhecidos como sendo as melhores fontes de lipases. As espécies que apresentam maior potencial de produção de lipases pertencem aos gêneros *Geotrichum*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Rhizomucor*. O fungo selecionado

nesta fermentação pertence ao gênero *Aspergillus*, sendo um promissor fungo para obtenção de lipases [29].

A partir desses resultados optou-se por prosseguir o estudo utilizando os níveis que apresentaram os valores mais elevados para a produtividade enzimática, sendo então realizado um planejamento experimental do tipo fatorial completo 2^2 com dois pontos centrais para estudar o efeito da umidade e da concentração de óleo de soja (indutor selecionado) sobre a produção de lipases pelo fungo filamentoso *Aspergillus niger* cepa O-4 (microrganismo selecionado).

3.2 Efeito da umidade e da concentração de indutor

A tabela 3 apresenta os resultados de atividade de hidrólise após seis dias de fermentação para os ensaios previstos no planejamento fatorial completo 2^2 com dois pontos centrais. As maiores atividades de hidrólise, em torno de 25 U/g, foram obtidas na condição de 2% de óleo de soja e 65% de umidade, em 6 dias de fermentação.

*Tabela 3. Resultados de atividade de hidrólise das lipases produzidas nas condições do planejamento fatorial completo 2^2 com dois pontos centrais utilizado na avaliação do efeito da umidade e da concentração do óleo de soja com o fungo *Aspergillus niger* O-4*

| Experimento | X ₁ (Umidade, %) | X ₂ (Óleo de soja, %) | AH (U/g)* |
|-------------|-----------------------------|----------------------------------|--------------|
| 10 | 60 | 0 | 10,82 ± 0,31 |
| 11 | 70 | 0 | 7,77 ± 0,11 |
| 12 | 60 | 4 | 4,84 ± 0,59 |
| 13 | 70 | 4 | 0,00 ± 0,00 |
| 14 | 65 | 2 | 26,04 ± 1,32 |
| 15 | 65 | 2 | 24,18 ± 0,00 |

AH: atividade de hidrólise

* Resultados apresentados como média ± desvio padrão

No tempo inicial da fermentação obtiveram-se valores diferentes de zero para as atividades de hidrólise, o que pode ser explicado pelo fato do farelo puro apresentar uma certa atividade enzimática por grama de substrato seco [28].

A adição de óleo de soja na concentração de 4% em comparação aos ensaios não adicionados do indutor não ocasionou aumento na atividade hidrolítica. Alguns au-

tores demonstraram que a suplementação muitas vezes não leva ao aumento da produção de lipases, devido ao efeito de inibição por excesso de substrato. A suplementação de torta de soja com óleo de soja para a produção de lipases por fermentação em estado sólido, com o uso do fungo *Penicillium simplicicium*, pesquisado por Di Luccio et al [30], não causou aumento da produção de lipase. Esse fato foi comprovado visto que nos ensaios adicionados de 2% de óleo de soja, as atividades de hidrólise foram superiores àquelas obtidas com 0% e 4% do indutor.

A análise de variância (Tabela 4) dos resultados de produtividade mostrou que houve influência significativa ($p < 0,05$) de ambos os fatores de estudo (umidade e concentração de indutor) na resposta.

Verifica-se na tabela 4 que a curvatura foi significativa ($p < 0,05$), indicando a presença de um ponto de máximo nas atividades de hidrólise após 6 dias de fermentação, próximo aos pontos centrais do planejamento experimental. A análise dos efeitos indicou que a umidade apresentou efeito significativo negativo, com maiores atividades sendo obtidas em 60% de umidade. O aumento da umidade pode ocasionar a compactação e saturação do meio, diminuindo a oxigenação e, portanto, o crescimento fúngico e a produção de lipases [12]. A quantidade de água é considerada ótima no ponto de saturação do substrato e dependendo do tipo de substrato, pode variar entre 30% e 85% [31], justificando as quantidades escolhidas de umidade no planejamento.

Tabela 4. Análise de variância dos resultados de produtividade para os experimentos do planejamento fatorial completo 2²

| Fonte de variação | SQ | GL | QM | F | p |
|-----------------------------------|---------|----|---------|---------|--------|
| Umidade (X_1) | 0,4323 | 1 | 0,4323 | 29,75 | 0,0320 |
| Concentração de indutor (X_2) | 1,3129 | 1 | 1,3129 | 90,34 | 0,0109 |
| Interação ($X_1 * X_2$) | 0,0223 | 1 | 0,0223 | 1,53 | 0,3415 |
| Curvatura | 17,9635 | 1 | 17,9635 | 1236,02 | 0,0008 |
| Erro | 0,0291 | 2 | 0,0145 | | |

SQ: soma dos quadrados; GL: graus de liberdade; QM: quadrado médio; F: Fisher; p: probabilidade

Entretanto, deve ser salientado que a maior produtividade foi obtida no ponto central (comprovado pelo efeito significativo da curvatura), sendo esse efeito melhor

visualizado na figura 2, que mostra a superfície de resposta para a produtividade em função da umidade e da concentração de indutor.

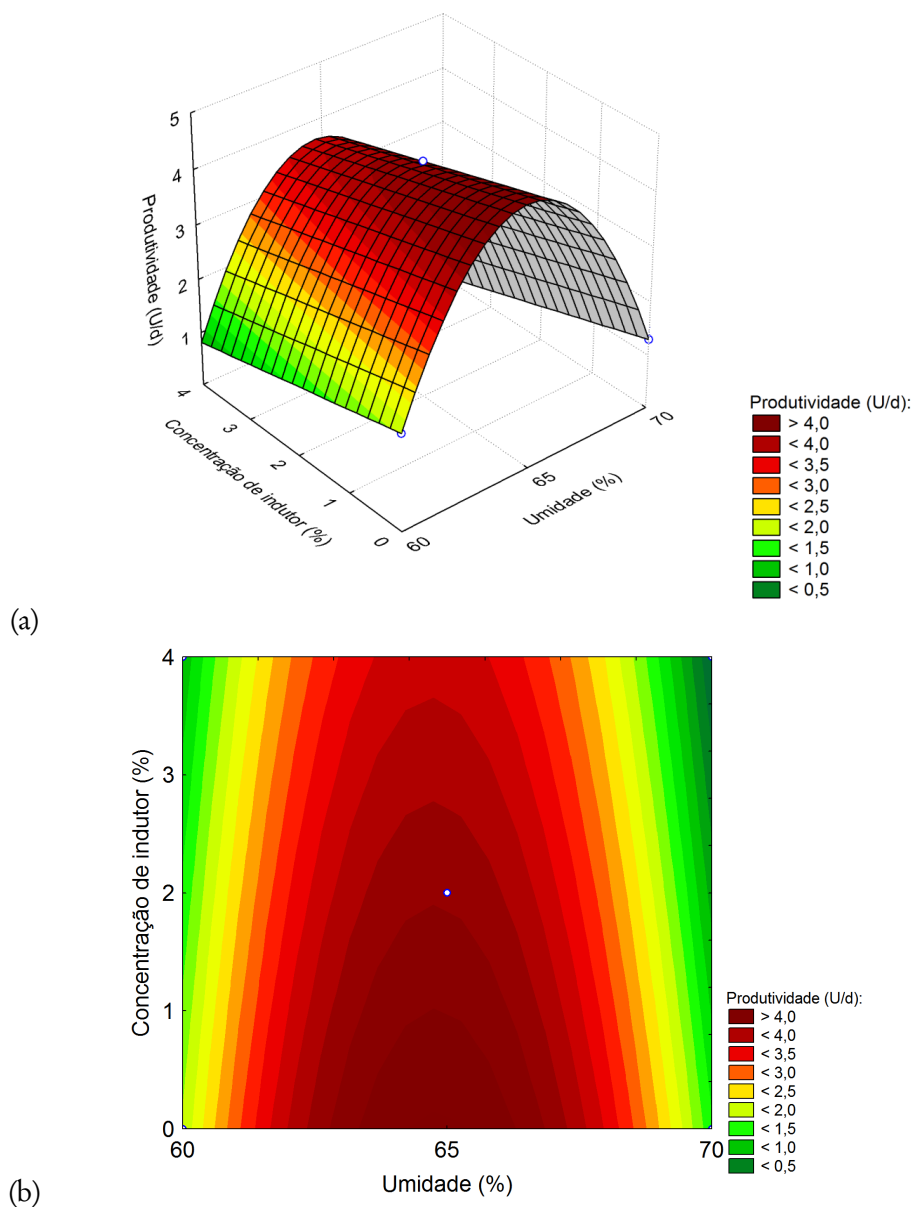


Figura 2. Produtividade das lipases do fungo *Aspergillus niger* cepa O-4 em função da umidade e da concentração de indutor durante a fermentação em estado sólido: (a) superfície de resposta da produtividade; (b) curvas de contorno da produtividade

A superfície de resposta mostrou que a umidade ideal estaria nos níveis centrais (65% de umidade), indicando que se pode usar umidade entre 62% e 67%, pois as atividades obtidas são muito semelhantes.

Segundo Fernandes [32], que avaliou a produção de lipases por fermentação em estado sólido, foram estudadas umidades de 35%, 45%, 55% e 65%, com melhores resultados em 55% de umidade, seguido da fermentação realizada com 65% de umidade. Nos cultivos com 35% de umidade não foi observada atividade de hidrólise.

A concentração do indutor apresentou efeito negativo significativo na análise dos efeitos após os seis dias de fermentação, indicando que as maiores atividades foram obtidas sem adição do indutor ou na condição de adição de 2% do indutor, corroborando os resultados anteriormente apresentados.

4 Conclusão

Na seleção de fungos filamentosos produtores de lipases, as maiores atividades de hidrólise foram obtidas com o fungo *Aspergillus niger* O-4 e com o óleo de soja como indutor. Para o estudo das variáveis umidade e concentração de indutor, ambas apresentaram influência significativa sobre a produção de enzima, sendo que as maiores atividades de hidrólise foram encontradas nos pontos centrais (65% de umidade e 2% de óleo de soja) para 6 dias de fermentação.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fapergs, ao CNPq e à UPF pelo fornecimento das bolsas de iniciação científica. Os autores agradecem também à Universidade de Passo Fundo e à Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões pela disponibilidade de realização do trabalho.

Referências

- [1] BCC RESEARCH. Global Markets for Enzymes in Industrial Applications. Disponível em: <http://www.bccresearch.com/pressroom/bio/>

- global-market-industrial-enzymes-reach-nearly-\protect\T1\textdollar7.1-billion-2018. Acesso em: out/2014.
- [2] MARKETS AND MARKETS. Industrial Enzymes Market by Type, Application, Brands & by Region — Global Trends and Forecasts to 2020. Disponível em: <http://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/industrial-enzymes-market-237327836.html>. Acesso em: dez/2015.
- [3] CASTRO, S. M.; CASTRO, A. M. Assessment of the Brazilian potential for the production of enzymes for biofuels from agroindustrial materials. *Biomass Convers Biorefin*, vol. 2, n. 1, p. 87-107, 2012.
- [4] TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; MAZUTTI, M. A.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, V. J. A review on microbial lipases production. *Food Bioprocess Tech*, vol. 3, n. 2, p. 182-196, 2010.
- [5] CONTESINI, F. J.; LOPES, D. B.; MACEDO, G. A.; NASCIMENTO, M. G.; CARVALHO, P. O. *Aspergillus* sp. Lipase: Potential biocatalyst for industrial use. *J Mol Catal B-Enzym*, vol. 67, n. 3-4, p. 163-171, 2010.
- [6] MESSIAS, J. M.; COSTA, B. Z.; LIMA, V. M. G.; GIESE, E. C.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. Lipases microbianas: produção propriedades e aplicações biotecnológicas. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*, vol. 32, n. 2, p. 213-234, 2011.
- [7] COLLA, L. M.; REINEHR, C. O.; COSTA, J. A. V. Aplicações e produção de lipases microbianas. *Revista CIATEC-UPF*, vol. 4, n. 2, p. 1-14, 2012.
- [8] SINGH, A. K.; MUKHOPADHYAY, M. Overview of fungal lipase: A review. *Appl Biochem Biotech*, vol. 166, n. 2, p. 486-520, 2012.
- [9] NAGARAJAN, S. New tools for exploring “old friends-microbial lipases”. *Appl Biochem Biotech*, vol. 168, n. 5, p. 1163-1196, 2012.
- [10] KAPOOR, M.; GUPTA, M. N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. *Process Biochem*, vol. 47, n. 4, p. 555-569, 2012.

- [11] COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to food industry – a review. *J Food Eng*, vol. 76, n. 3, p. 291-302, 2006.
- [12] PANDEY, A. Solid-state fermentation. *Biochem Eng J*, vol. 13, n. 2-3, p. 81-84, 2003.
- [13] GRIEBELER, N.; POLLONI, A. E.; REMONATTO, D.; ARBTER, F.; VARDANEGA, R.; CECHE, J. L.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.; CANSIAN, R. L.; RIGO, E.; NINOW, J. L. Isolation and screening of lipase-producing fungi with hydrolytic activity. *Food Bioprocess Tech*, vol. 4, n. 4, p. 578-586, 2011.
- [14] WOLSKI, E.; MENUSI, E.; REMONATTO, D.; VARDANEGA, R.; ARBTER, F.; RIGO, E.; NINOW, J.; MAZUTTI, M. A.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. Partial characterization of lipases produced by a newly isolated *Penicillium* sp. in solid state and submerged fermentation: a comparative study. *LWT-Food Sci Technol*, v. 42, n. 9, p. 1557-1560, 2009.
- [15] SETHI, B. K.; ROUT, J. R.; DAS, R.; NANDA, P. K.; SAHOO, S. L. Lipase production by *Aspergillus terreus* using mustard seed oil cake as a carbon source. *Ann of Microbiol*, vol. 63, n. 1, p. 241-252, 2013.
- [16] LÓPEZ, E.; DEIVE, F. J.; LONGO, M. A.; SANROMÁN, M. A. Strategies for utilisation of food-processing wastes to produce lipases in solid-state cultures of *Rhizopus oryzae*. *Bioproc Biosyst Eng*, vol. 33, n. 8, p. 929-935, 2010.
- [17] CORADI, G. V.; VISITAÇÃO, V. L.; LIMA, E. A.; SAITO, L. Y. T.; PALMIERI, D. A.; TAKITA, M. A.; OLIVA NETO, P.; LIMA, V. M. G. Comparing submerged and solid-state fermentation of agro-industrial residues for the production and characterization of lipase by *Trichoderma harzianum*. *Ann Microbiol*, vol. 63, n. 2, p. 533-540, 2013.
- [18] COLLA, L. M.; REZZADORI, K.; CÂMARA, S. K.; DEBON, J.; TIBOLLA, M.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. A solid-state bioprocess for selecting

- lipase-producing filamentous fungi. *Z Naturforschung C*, vol. 64, n. 1-2, p. 131-137, 2009.
- [19] SMANIOTTO, A.; SKOVRONSKI, A.; RIGO, E.; TSAI, S. M.; DURRER, A.; FOLTRAN, L. L.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J. V.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. "Synthetic lipase" production from a newly isolated *Sporidobolus pararoseus* strain by submerged fermentation. *Braz J Microbiol*, vol. 43, n. 4, p. 1490-1498, 2012.
- [20] REINEHR, C. O.; RIZZARDI, J.; SILVA, M. F.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.; COLLA, L. M. Produção de lipases de *Aspergillus niger* e *Aspergillus fumigatus* através de fermentação em estado sólido, avaliação da especificidade do substrato e seu uso em reações de esterificação e alcoólise. *Quim Nova*, vol. 37, n. 3, p. 454-460, 2014.
- [21] BURKERT, J. F. M.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design. *Biore-source Technol*, vol. 91, n. 1, p. 77-84, 2004.
- [22] DAMASO, M. C. T.; PASSIANOTO, M. A.; FREITAS, S. C.; FREIRE, D. M. G.; LAGO, R. C. A.; COUR, S. Utilization of agroindustrial residues for lipase production by solid-state fermentation. *Braz J Microbiol*, vol. 39, n. 4, p. 676-681, 2008.
- [23] COSTA, J. B.; ROSSI, D. M.; SOUZA, E. A.; SAMIOS, D.; BREGALDA, F.; PERALBA, M. C. R.; FLORES, S. H.; AYUB, M. A. Z. The optimization of biohydrogen production by bacteria using residual glycerol from biodiesel synthesis. *J Environ Sci A*, vol. 46, n. 13, p. 1461-1468, 2011.
- [24] OLIVEIRA, B. H.; CORADI, G. V.; ATTILI-ANGELIS, D.; SCAURI, C.; LUQUES, A. H. P. G.; BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H.; OLIVA NETO, P.; LIMA, V. M. G. Comparison of lipase production on crambe oil and meal by *Fusarium* sp. (*Gibberella fujikuroi* complex). *Eur J Lipid Sci Tech*, vol. 115, n. 12, p. 1413-1425, 2013.

- [25] PASTORE, G. M.; COSTA, V. S. R.; KOBLITZ, M. G. B. Purificação parcial e caracterização bioquímica de lipase extracelular produzida por nova linhagem de *Rhizopus* sp. *Ciencia Tecnol Alime*, vol. 23, n. 2, p. 135-140, 2003.
- [26] RIVALDI, J. D.; SARROUH, B. F.; FIORILO, R.; SILVA, S. S. Glicerol de biodiesel: estratégias biotecnológicas para o aproveitamento do glicerol gerado da produção de biodiesel. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, vol. 37, p. 44-51, 2010.
- [27] BARBOSA, C. R. Avaliação do glicerol proveniente da fabricação do biodiesel como substrato para produção de endotoxinas por *Bacillus thuringiensis* var. israelensis. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, Lorena, 2009.
- [28] RIGO, E.; NINOW, J. L.; TSAI, S. M.; DURRER, A.; FOLTRAN, L. L.; REMONATTO, D.; SYCHOSKI, M.; VARDANEGA, R.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.; DI LUCCIO, M. Preliminary characterization of novel extracellular lipase from *Penicillium crustosum* under solid-state fermentation and its potential application for triglycerides hydrolysis. *Food Bioprocess Tech*, vol. 5, n. 5, p. 1592-1600, 2012.
- [29] CARDENAS, F.; CASTRO, M. S.; SANCHEZ-MONTERO, J. M.; SINISTERRA, J. V.; VALMASEDA, M.; ELSON, S. W.; ALVAREZ, E. Novel microbial lipases: catalytic activity in reactions in organic media. *Enzyme Microb Tech*, vol. 28, n. 2-3, p. 145-154, 2001.
- [30] DI LUCCIO, M.; CAPRA, F.; RIBEIRO, N. P.; VARGAS, G. D. L. P.; FREIRE, D. M. G.; OLIVEIRA, D. Effect of temperature, moisture, and carbon supplementation on lipase production by solid-state fermentation of soy cake by *Penicillium simplicissimum*. *Appl Biochem Biotech*, vol. 113, p. 173-180, 2004.
- [31] BELLON-MAUREL, V.; ORLIAC, O.; CHRISTEN, P. Sensors and measurements in solid state fermentation: a review. *Process Biochem*, vol. 38, n. 6, p. 881-896, 2003.

- [32] FERNANDES, M. L. M. Produção de lipases por fermentação no estado sólido e sua utilização em biocatálise. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.